

Evidencia de *S. aureus* productor de enterotoxinas aislados de mastitis bovina en sistemas doble propósito

Evidence of producing *S. aureus* enterotoxins isolated from bovine mastitis in dual purpose systems

Victoria Jaramillo-García¹, Alfonso Calderón-Rangel¹ y Virginia Rodríguez-Rodríguez²

RESUMEN

Una limitante en los sistemas de producción de leche es la mastitis bovina. El objetivo fue determinar la producción de enterotoxinas A, B, C y D en cepas de *S. aureus* aisladas de casos de mastitis bovina en sistemas doble propósito en Córdoba (Colombia). Se obtuvieron 25 cepas de una bacterioteca existente. La identificación se realizó por crecimiento en diferentes medios de cultivo mediante pruebas bioquímicas. Se confirmó la identificación como *S. aureus* utilizando PCR para la detección del gen *nuc*. Se evaluó la susceptibilidad antibacteriana y la producción de enterotoxinas mediante un sistema de aglutinación pasiva reversa en latex. Las 25 cepas fueron clasificadas como *S. aureus*, ya que mostraron resultados positivos en las pruebas implementadas. Todas fueron sensibles a MRSA y en un *S. aureus* se evidenció la producción de enterotoxina C.

Palabras clave: intoxicaciones alimentarias, leche, PCR, salud pública, zoonosis.

ABSTRACT

Bovine mastitis is the most important limitation in cattle production systems. The main aim of this study was to determine the production of enterotoxin A, B, C and D in *S. aureus* strains isolated from bovine mastitis cases in double systems in Córdoba (Colombia). The 25 strains were obtained from an existing bacterioteca of previous study of bovine mastitis. The identification was performed by growth in different growth media, commercial biochemical tests and an automated system. The identification of *nuc* gene to *S. aureus* was confirmed by means PCR. Antibacterial susceptibility and enterotoxin production were evaluated using a commercial kit. The 25 strains were classified as *S. aureus* as they showed positive results in the implemented tests. All the strains showed methicillin sensitivity and one *S. aureus* strain showed enterotoxin C production.

Key words: food intoxications, milk, PCR, public health, zoonoses.

Introducción

La mastitis bovina se define como un proceso inflamatorio de las glándulas mamarias, esta reacción origina variaciones en las propiedades físicas y químicas de la leche, aumento en el número de células somáticas y en casos extremos pérdida de la funcionalidad. Este proceso inflamatorio se origina como resultado de los tejidos a injurias traumáticas, sustancias irritantes o la presencia de agentes etiológicos infecciosos o sus toxinas que han alcanzado y colonizado el tejido alveolar o secretor (Miller y Bartlett, 2004). Se trata de una de las principales limitantes en sistemas de producción de leche, por la disminución del volumen y la calidad (Seegers *et al.*, 2003; Calderón *et al.*, 2011).

La leche representa un excelente sustrato para el crecimiento de *S. aureus* y su presencia en los alimentos se debe al uso de materia prima contaminada, leches provenientes

de casos de mastitis, alimentos procesados por contaminación desde los manipuladores de alimentos o por prácticas inadecuadas de manufactura (Figuerola *et al.*, 2002). El objetivo fue determinar la producción de enterotoxinas en cepas de *S. aureus* aisladas de casos de mastitis bovina en Montería, Córdoba (Colombia).

Materiales y métodos

Se tomaron 25 cepas de *S. aureus* de una bacterioteca del Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico (IIBT) de la Universidad de Córdoba; aisladas de estudios previos de mastitis en sistemas doble propósito en Montería.

Las 25 cepas se reactivaron en agar sangre para confirmar género y especie. Se sometieron a tinción de Gram, a prueba de catalasa y de coagulasa en tubo, pruebas de identificación bioquímica comercial (Api Staph, Biomerieux,

¹ Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico (IIBT), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Córdoba. Montería (Colombia). acalderonr@correo.unicordoba.edu.co

² Grupo de Investigaciones Microbiológicas y Biomédicas de Córdoba (GIMBIC), Programa de Bacteriología, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad de Córdoba. Montería (Colombia).

France) que confirmó con un 99,9% la identificación de *S. aureus*. La sensibilidad antimicrobiana se evaluó de acuerdo al método de difusión en agar con base a Kirby-Bauer (CLSI, 2012), y la resistencia a la meticilina (MRSA) con el kit Oxacillin Resistance Screening agar base de Oxoid, suplementado con Orsab Selective. Estos procedimientos se realizaron de acuerdo a las indicaciones de las casas comerciales. Se implementó la determinación del gen *nuc* que codifica para una proteína de la nucleasa termoestable con una masa molecular de 17.000 DA y que codifica para el gen *nuc*, el cual permite la identificación molecular de *S. aureus*. Los iniciadores usados y las condiciones de la PCR fueron los propuestos por Brakstad *et al.* (1992).

La determinación de las enterotoxinas se implementó con el uso de un kit comercial SET-RPLA™ (TD0900 de Oxoid, Hampshire, Inglaterra), que detecta toxinas estafilocócicas A, B, C y D en muestras de alimentos o filtrados de cultivo por aglutinación en látex pasiva inversa (RPLA). El procedimiento se realizó de acuerdo a las indicaciones de la casa comercial.

Resultados y discusión

Las 25 cepas fueron consideradas como *S. aureus* mediante los sistemas convencionales y comerciales de identificación bioquímica (Api Staph, Biomerieux, France). En la figura 1 se muestra la detección del gen *nuc* que es específica para confirmar *S. aureus*, ya que los métodos convencionales y comerciales de caracterización fenotípica hacen que especies asociadas a mastitis bovina como *S. intermedius*, *S. epidermidis*, *S. sciuri* o *S. hyicus* (Rajiv *et al.*, 2013) muestren resultados positivos en algunas pruebas fenotípicas (Gandra *et al.*, 2005).

Cuando se relacionó el grado de mastitis causado por las 25 cepas de *S. aureus*, cuatro (16%) provinieron de casos de mastitis clínica, siete (29%) de casos de mastitis subclínica grado 3 y catorce (55%) de mastitis subclínica grado 2.

Sólo una cepa (4%) produjo la visualización de enterotoxina C, esta cepa productora de enterotoxina provino de un caso de mastitis clínica de una empresa ganadera con ordeño mecánico

Las mastitis por *S. aureus* representan un riesgo en salud pública por la presencia de las enterotoxinas, y casos de mastitis subclínicas puede estar relacionado con cepas características con la expresión de los factores de virulencia (Zecconi *et al.*, 2006). Aislamientos de *S. aureus* provenientes de casos de mastitis bovina han detectado

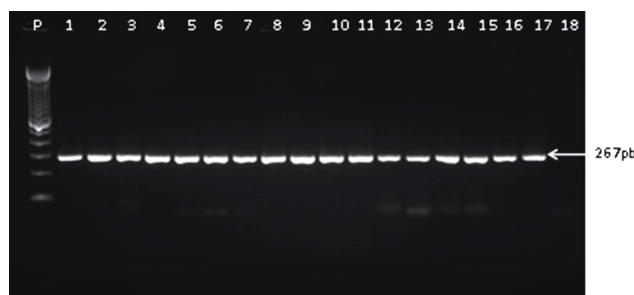


FIGURA 1. Aislamientos de *S. aureus* a partir de muestras de leche cruda donde por PCR se determina el gen *nuc*. P: marcador de peso molecular (100pb Invitrogen); carriles 1 al 16 aislamiento de *S. aureus* (267pb); carril 17: control positivo; carril 18: control negativo.

la presencia de SE, por ejemplo, en Brasil (da Silva *et al.*, 2005; Nader *et al.*, 2007) y en Japón (Katsuda *et al.*, 2005). Si bien la pasteurización inactiva las bacterias, las enterotoxinas son termoestables y retienen su actividad biológica (Asao *et al.*, 2003; Morandi *et al.*, 2007). El grado de intensidad de los síntomas obedece al volumen de alimento contaminado e ingerido, la concentración de la enterotoxina y de la susceptibilidad individual, que está influenciada por la edad y el estado inmunológico. La presencia de SE es una problemática para la salud pública (Zendejas *et al.*, 2014).

El 100% de las cepas de *S. aureus* mostraron sensibilidad a meticilina. Los resultados obtenidos muestran que la resistencia de las cepas aisladas de campo actualmente no es una problemática significativa en las vacas de este sistema de producción, y es posible que el menor grado de intensificación de la producción de leche, por ejemplo en el uso de antibióticos, hace que la problemática aún no sea de gran impacto, aunque se debe seguir monitoreando la sensibilidad antibacteriana. La presencia de SARM en alimentos ya fue demostrada (Vanegas *et al.*, 2012), y recientemente una cepa MRSA multiresistente de un caso de mastitis bovina fue encontrada en la Sabana de Bogotá (Hernández *et al.*, 2013), y en quesos artesanales se hallaron 5 cepas MRSA, donde se detectó la presencia del gen para la SEB, siendo el primer reporte de SE en cepas MRSA (Herrera y Santos, 2015).

Conclusiones

En relación con el *S. aureus* productores de enterotoxinas, la C es la más aislada de leche de casos de mastitis en bovino. Estos resultados son de importancia en salud pública, teniendo en cuenta que las enterotoxinas son proteínas altamente termoestables, capaces incluso de soportar la acción de enzimas digestivas.

Literatura citada

- Asao, T., Y. Kumeda y T. Kawai. 2003. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiol. Infect.* 130, 33-40. Doi: 10.1017/S0950268802007951
- Brakstad, O.G. K. Aasbakk y A. Maeland. 1992. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. *J. Clin. Microbiol.* 30(7), 1654-1660.
- Calderón, A., M.R. Arteaga y V.C. Rodríguez. 2011. Efecto de la mastitis subclínica sobre el rendimiento en la fabricación del queso costeño. *Biosalud* 10(2), 16-27.
- CLSI. 2012. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard 9th ed. Document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania.
- Da Silva, E.R., J.U.D. Boechat y N. da Silva. 2005. Coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis in southeastern Brazil. *Can. J. Vet. Res.* 69(4), 260-264.
- Figueroa, G.G., P.W. Navarrete y M.C. Caro. 2002. Portación de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénicos en manipuladores de alimentos. *Rev. Med. Chil.* 130, 859-864. Doi: 10.4067/S0034-98872002000800003
- Gandra, A.E., J.A. Silva y P. M.R. De Macedo. 2005. Differentiation between *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* using phenotypical tests and PCR. *Alim. Nutr.* 16(2), 99-103.
- Hernández, J., D. Benavides y R. Pérez. 2013. Evaluación de concentración mínima inhibitoria en aislamientos de *Staphylococcus aureus* provenientes de muestras de leche de vacas con mastitis. pp. 168-169. XL Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay.
- Herrera, A.F. y B.J. Santos. 2015. Presencia de *Staphylococcus aureus* meticilinaresistentes en queso doble crema artesanal. *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.* 18(1), 29-37.
- Katsuda, K., E. Hata y H. Kobayashi. 2005. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis milk on the basis of toxin genes and coagulase gene polymorphisms. *Vet. Microbiol.* 105(3-4), 301-305. Doi: 10.1016/j.vetmic.2004.12.004
- Miller, G. y P. Bartlett. 2004. Economic effects of mastitis prevention strategies for dairy producers. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 198, 227-231.
- Morandi, S., M. Brasca y R. Lodi. 2007. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. *Vet Microbiol.* 124(1-2), 66-72. Doi: 10.1016/j.vetmic.2007.03.014
- Nader, F.A., L.M. Ferreira y L.A. Amaral. 2007. Produção de enterotoxinas e da toxina da síndrome do choque tóxico por cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas na mastite bovina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 59(5), 1316-1318. Doi: 10.1590/S0102-09352007000500032
- Rajiv, N.K., S. Isloor y V.V.V. Suryanarayana. 2013. Genotyping by *icaA* gene based PCR of *Staphylococcus* strains isolated from bovine mastitis cases. *Indian J. Biotechnol.* 12, 541-543.
- Seegers, H., C. Fourichon y F. Beaudeau. 2003. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet. Res.* 34, 475-491. Doi: 10.1051/vetres:2003027
- Vanegas, L.M.C., J.E. Moreno y R.V. Ramos. 2012. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from Colombian Foods. *BIO* 2, 61-67. Doi: 10.5618/bio.2012.v2.n1.6
- Zecconi, A., L. Cesaris y E. Liandris. 2006. Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microb. Pathog.* 40(4), 177-183. Doi: 10.1016/j.micpath.2006.01.001
- Zendejas, M.G.S., F. H. Avalos y P.M.Y Soto. 2014. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Rev. Biomed.* 25, 129-143.